

Vliv teploty při tzv. termolýze na morfologii a strukturu kvasničných buněk

663.1 663.872

Dr. LUBOMÍR ADÁMEK, Ing. MILOSLAV RUT, Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, Praha
Dr. DAGMAR HULÍNSKÁ, CSc., Dr. HANA MOHELSKÁ, CSc., Institut hygieny a epidemiologie, Praha

Klíčová slova: krmné kvasnice, buňky, suspenze, termolýza, *Torulopsis ethanolitolerans*, struktura, destrukce, membrána, morfologie

Význam termolýzy při výrobě a užití sušených krmných kvasnic byl diskutován v naší předešlé práci [1]. Správné provedení tepelné úpravy usnadňuje tok mikrobiální suspenze při vysokých koncentracích biomasy a zvyšuje nutriční hodnotu výrobku. I když je tepelné opracování mikrobiální suspenze technicky jednoduchá operace, je energeticky náročná a při nesprávně provedené termolýze vznikají ztráty ve využití kapacity zařízení, ztráty energie a klesá jakost výrobku [2, 3]. Jako racionální způsob tepelné úpravy (termizace) bylo navrženo rychlé krátkodobé (2 až 4 min) zahřátí kvasničné suspenze na teplotu 80 až 90 °C s bezprostředně následujícími výrobními operacemi zahušťování a sušení. Pro posouzení stupně termolýzy bylo využito snadno měřitelných fyzikálních veličin, jako je změna viskozity suspenze a změna objemu odstředěné pevné fáze [1]. V této práci jsme se zaměřili na pozorování změny morfologie a struktury kvasničných buněk v závislosti na intenzitě a době tepelné úpravy.

MATERIÁL A METODY

Použitý mikroorganismus

Vliv tepelné úpravy mikrobiální suspenze na morfologii a strukturu buněk byl zkoumán s kmenem *Torulopsis ethanolitolerans* RIF1 235, tj. s kulturou využívanou v závodě Seliko Kojetín k výrobě sušených krmných kvasnic ze syntetického ethanolu. Kultura byla připravena kultivací na syntetické půdě s ethanolem běžně používaným laboratorním postupem [4]. Biomasa byla izolována odstředěním na laboratorní odstředivce Westfalia LWA-205 v komorovém uspořádání. Ze získané pasty kultury s obsahem 22 až 22,5 % hmot. sušiny bylo připraveno kvasničné mléko 15 % hmot. sušiny ředěním pitnou vodou při laboratorní teplotě.

Technika termolýzy

Část kvasničného mléka byla opracována podle režimu, který odpovídá technologickému postupu při výrobě krmných ethanolových kvasnic (vyhřívání v nádobě opatřené parním hadem a duplikátorem). Suspenze kvasnic ve skleněné nádobě byla ve vodní lázni 90 °C vyhřívána za míchání na 80 °C a při této teplotě ponechána po dobu 30 minut. Poté byla ochlazená na 20 °C (hrubá termizace).

Druhá část kvasničného mléka se čerpala kovovým hadem [1] ponořeným ve vodní lázni 80 °C takovou rychlostí, aby doba zdržení při teplotě 80 °C byla 2 až 3 minuty (šetrná termizace). Na výstupu protékala suspenze chladičem, ve kterém se zchladila na 20 °C. Tento postup odpovídá provoznímu způsobu termolýzy za použití kontaktního ohříváče [3]. Zbývající část 15 % kvasničné suspenze se ponechala bez úpravy jako kontrola pro porovnání rozdílů mezi jednotlivými režimy tepelné úpravy.

Stanovení extracelulární kvasničné sušiny

100 g vzorku suspenze se odstředí na kyvetové odstředivce při 3000 ot min⁻¹ po dobu 10 minut. Supernatant se slíje, zváží a z alikvotního podílu se stanoví sušina odpařením na vodní lázni a dosušením při 105 °C do konstantní váhy. Sediment se převede s pitnou vodou do odměrné baňky 250 ml a z alikvotního podílu se stanoví sušina stejným způsobem. Extracelulární sušina je podíl sušiny supernatantu vyjádřený v % hmot. na sušinu buněk, z níž pochází.

Všechny 3 skupiny různě opracovaných kvasničných suspenzí byly podrobeny mikroskopickému vyšetření ve

světelném a elektronovém mikroskopu ke zjištění změn v morfologii a v ultrastruktuře kvasničných buněk. Pro sledování ve světelném mikroskopu byl pozorovaný materiál použit bez úpravy, pro potřeby elektronové mikroskopie se použily speciální techniky celkových preparátů, ultratenkých řezů a vizualizace buněčných povrchů.

Zpracování vzorků pro elektronovou mikroskopii

Celkové preparáty byly připraveny tímto způsobem: Vzorky kvasničných suspenzí byly proprány kakodylátovým pufrům 0,1 mol . l⁻¹ o pH 7,2, buněčná biomasa byla oddělena centrifugací při 4000 ot za minutu po dobu 15 minut. Vzorek byl 2krát fixován 1% OsO₄ ve stejném pufru a opět centrifugován. Po dalším trojnásobném promytí fyziologickým roztokem a centrifugací se sediment zředil na odpovídající koncentraci kvasinek, nanášel se na pouhlikované formvarové fólie a byl pokoven Au : Pd = 40 : 60 pod úhlem 20°.

Ultratenké řezy byly připraveny fixačním postupem podle Ryterové [5], založeném na dvojité fixáži OsO₄ v Michaelisově acetát-verovalovém pufru. Takto připravené vzorky byly dehydratovány stoupající ethanolovou řadou a převedeny přes propylenoxid do Eponu. Jak se nám osvědčilo při jiném biologickém materiálu, těžko prostupným pro zalévací médium, prodloužili jsme především intervaly převádění vzorků z ethanolu do zalévacího média, tj. fázi prosycování zalévacím médiem. Vzorky byly řezány na Ultratomu LKB I. a LKB III. Řezy byly kontrastovány 0,5 % uranylacetátem v 50 % ethanolu a plumbumcitrátem [6].

Pro hodnocení charakteru povrchu kvasničných buněk po tepelné úpravě kvasinek se použila speciální metodika rastrovací (scanning) elektronové mikroskopie.

Nejlépe se nám osvědčila vakuová metoda fixace modifikující Karnowského glutaraldehyd-paraformaldehydovou fixací [7] a modifikovaná metoda prosycení s thiosemikarbazidem (TSC) podle Hulínské et al. (nepublikováno), která vedla k zesílení biologické membrány kvasinek a tím ke snížení artefaktů, jež vznikají při sušení, pokovení a vystavení proudu elektronů v rastrovacím adaptéru.

Celkové preparáty a ultratenké řezy byly studovány v přístroji JEOL 100 CX II. v prozařovaném modu, pro preparáty povrchů kvasinek bylo použito scanning adaptéru JEOL ASID 4 D v rastrovacím (scanning) modu.

Velikost buněk se měřila ve světelném mikroskopu a na kontaktních pozitivních elektronogramů (zvětšení 3600krát) posuvným měřítkem, průměry stěn buněk na kontaktních pozitivních elektronogramů ultratenkých řezů (zvětšení 5500 krát) na světelném mikroskopu okulárovým mikrometrem Zeiss.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Vliv způsobu tepelné úpravy na morfologii kvasničných buněk je uveden v tabulce 1.

Vliv způsobu termolýzy na fyzikální vlastnosti kvasničné suspenze byl studován v předcházející práci [1], kde bylo prokázáno, že šetrná termizace splňuje požadavky na zlepšení toku hustých kvasničných suspenzí a na nutriční vlastnosti výrobku. Zlepšení fluidity kvasničné suspenze po termizaci lze však jen částečně vysvětlit změnou velikosti kvasničných buněk. Tyto změny byly pozorovány jen ve světelném mikroskopu. Na elektronogramech se neprojevovaly patrně proto, že přípravou vzorků pro elektronovou mikroskopii se rozdílly stírají.

Jestliže se po termizaci kvasničného mléka sníží jeho viskozita 3krát [1], potom by se podle Stokesova záko-

Tabulka 1. Vliv způsobu termizace na morfologii kvasničných buněk

Způsob termizace	Extracelulární sušina (%)	Rozměry buněk (μm)		
		ve svět. mikroskopu (×d)	délka na elektro-nogramu	průměr stěny
kontrola	3,7	3,5×8,3	4,86	0,138
šetrná	10,3	2,7×6,8	5,04	0,128
hrubá	11,6	2,7×6,7	5,31	0,145

na měly obdobně změnit i rozměry buněk. To však nebylo pozorováním morfologie a struktury kvasničných buněk elektronovým mikroskopem prokázáno.

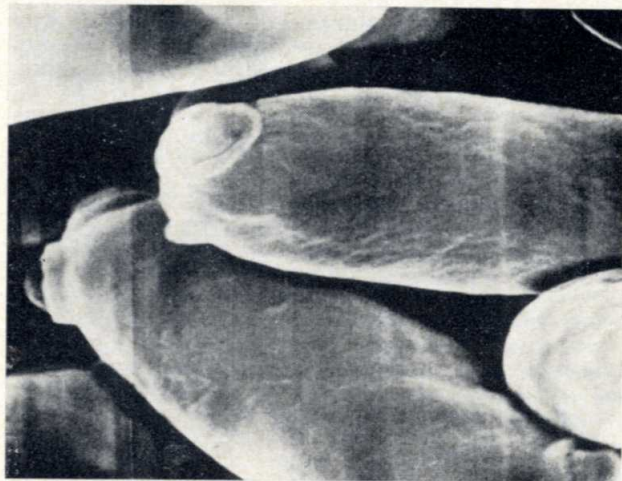
Nepozorovala se ani žádná významná změna integrity buněk, tj. např. protržení buněčných stěn, vyliší cytosolu apod. Zvýšení koncentrace extracelulární sušiny v supernatantu bylo jen úměrné smrštění buněk [1].

Z toho vyplývá, že na vysokou viskozitu nativní kvasničné suspenze mají vliv i jiné než sterické faktory a že jsou to síly, které spíše než s velikostí buněk souvisí s jejich biologickou aktivitou (elektrostatický náboj, extracelulární mikroprostředí buněk).

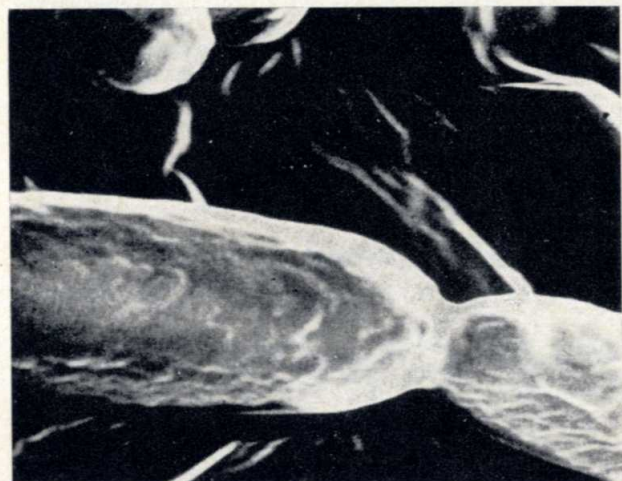
Morfologické změny povrchů kvasinek při zmenšování objemu kvasničných buněk po tepelném opracování dokumentují obrázky preparátů pořízených rastrovací (scanning) elektronovou mikroskopií (obr. 1–3). Na připravených preparátech je zřejmé, že vlivem expozice kvasinek při teplotě 80 °C dochází k významnému zvrásnění povrchů buněk, a to v přímé závislosti na době působení. Zatímco u kontrolní suspenze kvasinek je povrch buněk zvrásněn jen velmi nepatrně jemnými cirkulárními rýhami (obr. 1), již po krátké expozici při teplotě 80 °C dochází k podélnému zřasování povrchu kvasinek (obr. 2). Po další expozici při zvýšené teplotě dochází ke zřasování ve více směrech (obr. 3).

Velmi závažné je zjištění, že u tepelně opracovaných suspenzí kvasinek nebyla ani po 30 minutách expozice 80 °C porušena celistvost buněk, což může být důkazem jejich značné rezistence. To svědčí rovněž i o tom, že dosud všeobecně používaný termín „termolýza“ nevystihuje charakter prováděného procesu.

Tepelné opracování (termizace) postihuje hlavně aktivitu vnitrobuněčných enzymů a způsobuje ireverzibilní změny na vnitřních strukturách buněk. Silné letální poškození buněčných organel je možno pozorovat na preparátech ultratenkých řezů u obou skupin různě tepelně opracovaných suspenzí kvasinek. Zatímco buňky kvasničné suspenze před termizací obsahují kromě celistvé stěny, vysoce husté cytoplasmu s bohatými invaginacemi cytoplasmatické membrány, velká jádra a málo drobných vakuol, obě pokusné skupiny tepelně



Obr. 2. Kvasinky *Torulopsis ethanolitolerans* (šetrné tepelné opracování — 3 minuty, 80 °C)



Obr. 3. Kvasinky *Torulopsis ethanolitolerans* (hrubé tepelné opracování — 30 minut 80 °C)

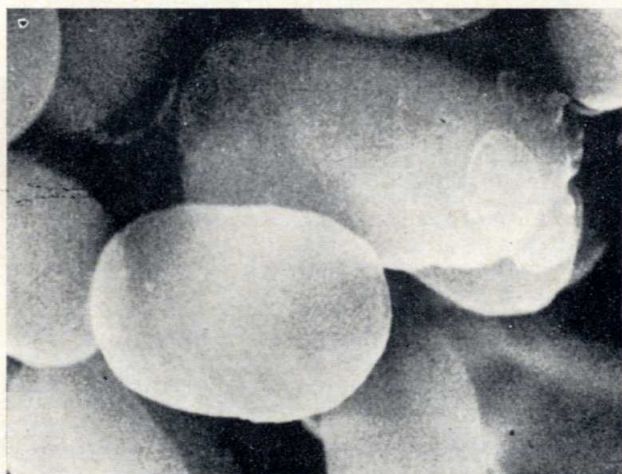
různě opracovaných suspenzí kvasinek vykazují patologické nálezy. Celistvost buněčných stěn je sice zachována, ale dochází ke změnám na cytoplasmatické membráně, kde se invaginace ztrácejí a je pozorovatelné pouze lehké vlnění. Oproti kontrolní suspenzi dochází k hrubé vakuolizaci cytoplasmu a ke zduřování mitochondrií.

V tomto ohledu je důležité to, že se nezjistil významný rozdíl v letálním poškození intracelulárních struktur kvasinek tepelně hrubě a šetrně opracovaných, což svědčí o tom, že termizace provedená šetrným způsobem je stejně účinná jako déletrvajícím působením teploty.

Literatura

- [1] RUT, M., ADÁMEK, L., ŠTROS, F., KARNET, J., ŠIMEK, V.: Kvas. prům. 30, 1984, s. 246.
- [2] RUT, M., ADÁMEK, L., ŠTRCS, F.: Kvas. prům. 32, 1986, s. 129.
- [3] ADÁMEK, L., RUT, M., ŠTRCS, F., EDERER, K., ŠESTÁK, F.: Kvas. prům. 32, 1986, s. 61.
- [4] ADÁMEK, L., ŠESTÁKOVÁ, M., RYBÁŘOVÁ, J., ŠTROS, F.: Kvas. prům. 27, 1981, s. 278.
- [5] RYTER, A., KELLENBERGER, E., BIRCH-ANDERSEN, A., MAALØE, O.: Z. Naturforsch. 13b, 1958, s. 597.
- [6] REYNOLDS, E. S.: J. Cell. Biol., 17, 1963, s. 208.
- [7] KARNOWSKI, M. J.: J. Cell. Biol., 27, 1965, s. 137.

Lektoroval Ing. František Štros, CSc.



Obr. 1. Kvasinky *Torulopsis ethanolitolerans* (tepelně neopracovaná kultura — kontrola)

Adámek, L. - Rut, M. - Hulínská, D. - Mohelská, H.: Vliv teploty při tzv. termolýze na morfologii a strukturu kvasničných buněk. Kvas. prům. 33, 1987, č. 10, s. 298—300.

Ve světelném mikroskopu a na elektronogramech se prokázalo, že termín používaný při výrobě krmných kvasnic — termolýza, nevystihuje přesně proces a představa o tom, co při tepelném opracování husté kvasničné suspenze probíhá. Při tepelném opracování *Torulopsis ethanolitolerans* RIFI 235 při teplotě 80 °C po dobu 3 až 30 minut se poškodí vnitrobuněčná struktura a membrány, avšak nedojde k protřetí buněčné stěny a lýzy cytosolu. Proces lépe vystihuje termín termizace.

Ададек, Л. - Рут, М. - Гулинская, Д. - Могельская, Г.: Влияние температуры при т. наз. термоллизе на морфологию и структуру дрожжевых клеток. Квас. прум. 33, 1987, № 10, стр. 298—300.

V světovém mikroskopu a na elektronogrammech bylo dokázáno, že termín, aplikovaný při výrobě krmných kvasnic — termolýza, neobsahuje přesně proces a představu o tom, co probíhá při tepelném zpracování husté kvasničné suspenze. Při tepelném zpracování *Torulopsis ethanolitolerans* RIFI 235 při teplotě 80 °C v průběhu 3—30 minut vnitrobuněčná struktura a membrány podléhají poškození, avšak nedochází k prolomení buněčné stěny a rozpouštění cytosolu. Více vyjadřavějším je termín „termizace“.

Adámek, L. - Rut, M. - Hulínská, D. - Mohelská, H.: Temperature Effect During the Thermolysis on Yeast Cell Morphology and Structure. Kvas. prům. 33, 1987, No. 10, pp. 298—300.

The term „thermolysis“ that is used in a fodder yeast production is not the best one from the standpoint of a description of a thermal treatment of a dense yeast suspension. The thermal treatment of *Torulopsis ethanolitolerans* RIFI 235 at the temperature of 80 °C during 3 to 30 min results in a damage of the intracellular structure and membrane. However, the cell wall remains unperforated. The process is better described by the term „termization“.

Adámek, L. - Rut, M. - Hulínská, D. - Mohelská, H.: Einfluß der Temperatur bei der sog. Thermolyse auf die Morphologie und Struktur der Hefezellen. Kvas. prům. 33, 1987, Nr. 10, S. 298—300.

Im Lichtmikroskop und auf Elektronogrammen wurde bewiesen, daß die bei der Futterhefeherstellung angewandte Bezeichnung Thermolyse nicht zutreffend den Prozeß charakterisiert, der bei der thermischen Bearbeitung der dickflüssigen Hefesuspension verläuft. Bei der Wärmebehandlung von *Torulopsis ethanolitolerans* RIFI 235 bei der Temperatur von 80 °C in der Dauer von 3 bis 30 Minuten werden zwar die intrazellulären Strukturen und Membranen beschädigt, aber das Durchreißen der Zellwände und die Lyse des Cytosols findet nicht statt. Deshalb wäre der Prozeß treffender durch die Bezeichnung Thermisation charakterisiert.